

ROMANIA OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	BREVET DE INVENȚIE ⁽¹⁹⁾ RO ⁽¹¹⁾ 103682 (12) DESCRIEREA INVENȚIEI	
(21) Cerere de brevet nr.: 137849 (22) Data înregistrării : 20.01.89 (61) Complementară la invenția brevet nr. : (45) Data publicării : 09.12.91	(51) Int. Cl. ⁴ : A 61 K 39/395; A 61 K 35/16	
(86) Cerere internațională(PCT) nr.: data: (87) Publicarea cererii internaționale nr.: data: (89)	(30) Prioritate : (32) Data : (33) Țara : (31) Certificat nr.	
(71) Solicitant; (73) Titular: Institutul Cantacuzino, București (72) Inventator: biolog Ioniță Aurel, biolog Ioniță Constantina, biolog Ioniță Emil, București		

(54) **Procedeu de izolare a ceruloplasminei umane**

(57) **Rezumat**

Procedeu conform invenției constă în aceea că serul sau plasma umană se tratează cu soluție CuSO_4 1 M (100 : 0,4) și apoi se menține la 68°C, timp de 30 min, se centrifughează, se cromatogra-

fiază întâi pe DEAE-Sepharose CL-68 în tampon 0,02 M pirofosfat de sodiu - acid acetic pH=7,5 și apoi pe Cibacron - Blue F₃GA - Bio-Gel A₅ m în TFS 0,05 M pH=7.

(19) RO ⁽¹¹⁾ 103682

Prezenta invenție se referă la un procedeu de izolare a ceruloplasminei, folosită pentru imunizarea animalelor, cu scopul obținerii antiserului necesar pentru evidențierea și determinarea cantitativă a acestei proteine plasmatică, care prezintă interes clinic în diagnosticarea și urmărirea evoluției unor afecțiuni, ca: neoplazii, afecțiuni inflamatoare și autoimune, afecțiuni hepatice etc.

Sînt cunoscute diferite metode de izolare a ceruloplasminei, cum ar fi, din fracțiunea IV-1 Cohn, care este suspendată în soluție 0,4% NaCl, adsorbție pe coloană DEAE - celuloză, eluare cu TFS 0,05 M pH=6, ce conține 1% NaCl și precipitare fracționată cu etanol-cloroform (1:1) sau această fracțiune este precipitată cu alcool, acetonă sau sulfat de amoniu. După dizolvare în tampon acetat 0,02 M pH=7,5, se aplică pe o coloană cromatografică DEAE - Sephadex A-50 echilibrată în același tampon. Eluarea a fost făcută cu 0,25 M NaCl și fracțiunea obținută s-a dizolvat în tampon acid acetic - acetat de sodiu pH 5,5, se centrifughează și supernatantul se aplică pe coloană cromatografică Sephadex C-50 echilibrată cu 0,02 M tampon acetat pH=5,5.

Scopul prezentei invenții este de a lărgi gama posibilităților de obținere a ceruloplasminei.

Problema pe care o rezolvă invenția este stabilirea condițiilor optime de izolare a acestei proteine.

Procedeul conform invenției constă în aceea că serul sau plasma umană se tratează cu soluție CuSO_4 1M (100:0,4) și apoi se menține la 68°C timp de 30 min, se centrifughează, se cromatografiază întâi pe DEAE-Sepharose CL-68 în tampon 0,02 M pirofosfat de sodiu - acid acetic pH=7,5 și apoi pe Cibacron-Blue F₃GA-Bio-Gel A₅ m în TFS 0,05 M pH 7.

Se dă mai departe un exemplu de realizare a invenției. La 3 l de ser, avînd tem-

peratura de 37°C, se adaugă, prin agitare, 12 ml soluție de sulfat de cupru 1 M. Recipientul în care se găsește acest ser se pune pe o baie de apă termostată la 68°C și se menține 30 min. După centrifugare la 5000 rot/min, timp de 30 min, supernatantul se dializează față de soluția tampon 0,02 M pirofosfat de sodiu-acid acetic, pH=7,5, și se aplică pe o coloană 2 x 80 cm de DEAE - Sepharose CL-6B, echilibrată în același tampon. Rata fluxului este de 1,5 ml/min. Coloana este spălată cu tampon de start (aproximativ 5000 ml); fracțiunea proteică albastră, bogată în ceruloplasmină, vizibilă în partea superioară a coloanei, este apoi eluată cu 0,25 M NaCl în tamponul de start. Această fracțiune este echilibrată în tampon fosfat de sodiu, 0,05 M, pH=7 și cromatografiată pe o coloană de Cibacron Blue F₃GA - Bio-Gel A-5 m, 2,5 x 100 cm, echilibrată în același tampon fosfat. Această procedură cromatografică se execută la temperatură joasă (+4...+10°C). Coloana se spală cu aproximativ 1300 ml tampon de start la o rată a fluxului de 1,5 ml/min, eluîndu-se proteinele nelegate de gel. În aceste condiții de lucru, ceruloplasmina este puternic legată, ea putînd fi eluată cu 0,8 M NaCl în tamponul fosfat de sodiu 0,05 M, pH=7. Recuperarea ceruloplasminei este de aproximativ 80% (circa 0,7 g din 3 l ser), iar puritatea este de cel puțin 95%. Același procedeu se poate aplica și în cazul cînd se folosește plasmă.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- permite obținerea unei bune purități și imunogenități;
- este simplu și ușor de aplicat.

Revendicare

Procedeu de izolare a ceruloplasminei, caracterizat prin aceea că serul sau plasma umană se tratează cu soluție CuSO_4 1 M (100 : 0,4) și apoi se menține